

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 6 月 27 日 (27.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/50297 A1

(51) 国際特許分類: C12P 13/02 // (C12P 13/02, C12R 1:01) (C12P 13/02, C12R 1:025) (C12P 13/02, C12R 1:07) (C12P 13/02, C12R 1:15) (C12P 13/02, C12R 1:18) (C12P 13/02, C12R 1:22) (C12P 13/02, C12R 1:265) (C12P 13/02, C12R 1:365) (C12P 13/02, C12R 1:38) (C12P 13/02, C12R 1:465)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11149

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 19 日 (19.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-387537  
2000 年 12 月 20 日 (20.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ダイヤニトリックス株式会社 (DIA-NITRIX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目 12 番 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村尾 耕三 (MURAO, Kozo) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 ダイヤニトリックス株式会社 技術研究所内 Kanagawa (JP). 石井 勝男 (ISHII, Katsuo) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 ダイヤニトリックス株式会社 技術研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5 森ビル 3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, IN, JP, KR, RU, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING AMIDE COMPOUND BY USING MICROBIAL CATALYST

(54) 発明の名称: 微生物触媒を用いたアミド化合物の製造方法

(57) Abstract: A process for producing an amide compound from a nitrile compound by using a microbial catalyst characterized in that microbial cells having a nitrile hydratase activity of at least 50 U/mg dry cells at a reaction temperature of 10°C, which are not in comprehensively immobilized, are brought into contact with a nitrile compound in an aqueous medium. According to this process in which microbial cells overexpressing the nitrile hydratase activity are used without comprehensive immobilization, the amide compound can be efficiently produced from the nitrile compound without causing the problem of lowering in the reaction speed or a decrease in the productivity per unit amount of the microbial cells due to the comprehensive immobilization. Accordingly, the amide compound can be produced within an extremely short period of time in case of a batch reaction, or by using equipment on a very small scale in case of a continuous reaction.

[続葉有]

WO 02/50297 A1



---

(57) 要約:

本発明は、微生物触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法において、反応温度10℃で乾燥菌体1mg当たり50U以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌体を包括固定化しないで水性媒体中でニトリル化合物と接触させることを特徴とする、アミド化合物の製造方法に関する。

本発明によれば、ニトリルヒドラーゼ活性を高発現した微生物菌体を包括固定化することなく反応に用いるので、包括固定化による反応速度の低下や単位菌体量当たりの生産量低下の問題を生じることなく、ニトリル化合物からアミド化合物を効率よく製造することができる。従って、回分式反応の際には非常に短時間に、連続式反応の際には非常に小規模の設備で、アミド化合物を製造することができる。

## 明 細 書

## 微生物触媒を用いたアミド化合物の製造方法

5 技術分野

本発明は、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法に関する。

背景技術

- 10 近年、生体触媒を利用して化合物を合成する方法は、反応条件が穏和であること、反応プロセスが簡略化できること、および副生物が少ないことによる反応生成物の純度が高いこと等の利点があるため、多くの化合物の製造に用いられている。

- アミド化合物の製造においても、ニトリル化合物からアミド化合物に変換する酵素、ニトリルヒドラーゼが見出されて以来、盛んに生体触媒の  
15 利用が検討されている（特開平 11-123098 号、特開平 7-265091 号、特公昭 56-38118 号、特開平 11-89575 号公報記載）。

- 現在では、操作性・安全性・経済性等の観点から優れた反応プロセスとしてアクリルアミドやニコチンアミド等の工業的生産にニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物が利用されている。  
20

- これまで、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物として非常に多くの微生物が見出されてきている。例えば、ノカルディア (Nocardia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、パチルス (Bacillus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、ロドコッカス  
25 (Rhodococcus) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、キサントバクタ

ー (Xanthobacter) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、エルウィニア (Erwinia) 属、エアロモナス (Aeromonas) 属、シトロバクター (Citrobacter) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属またはシュードノカルディア (Pseudonocardia) 属に属する微生物等が挙げられる。

その内、シュードモナス (Pseudomonas) 属、パチルス (Bacillus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シュードノカルディア (Pseudonocardia) 属は、非常に高活性で安定性の良いニトリルヒドラーターゼを発現するとして、工業化あるいは工業化に近いレベルで使用されている。

さらに、この様な微生物の培養の際、ニトリルやアミド類を添加する方法 (特公昭 61-43996 号、特公昭 61-43999 号)、アミノ酸を添加する方法 (特公昭 61-43997 号、特公昭 61-43998 号)、ある種の金属イオンを添加する方法 (特開昭 61-162193 号、特公平 6-55148 号、特開平 8-187092 号) 等によって、高活性のニトリルヒドラーターゼを保有する微生物菌体を得られることが知られている。

一方、生体触媒は熱に対して安定性が低いため、低温で反応させざるを得ず、結果的に触媒当たりの反応速度が低くなる。そのため、生体触媒を利用して化合物を工業生産する場合には、反応槽内の触媒濃度を高くする必要がある。

現在知られている生体触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する工業プロセスも同様に微生物菌体を包括固定化することで粒子状とし、反応槽内での触媒濃度を高くし、かつ触媒分離を容易にして実施されている (化学と工業 第 43 巻第 7 号 1098~1101 頁 (1990)、特開昭 54-143593 号、特開昭 54-144889 号公報参照)。また、該菌体の固定化方法

についても、検討されている（特開昭 57-39792 号、特開昭 62-294083 号公報参照）。さらには、工業的に効率よくアミド化合物を製造しようとする場合には、より高濃度に菌体を固定化することが重要であると考えられてきた（特開平 7-203964 号公報参照）。

- 5      しかし、発明者らがニトリルヒドラターゼ活性が高発現した微生物菌体を包括固定化し、反応に用いたところ、包括固定化粒子内で、反応基質であるニトリル化合物および／または反応生成物であるアミド化合物が、拡散不良を起こし、反応速度が著しく低下することが確認された。

- 10      例えば、包括固定化した菌体と包括固定化しない菌体との初期の反応速度を比較した場合、反応条件によっては  $1/10$  以下と著しく低下した。また、初期の反応速度が著しく低下するのみならず、拡散不良により反応に充分寄与していない包括固定化触媒内部の酵素も反応中活性の低下を引き起こすため、単位菌体量当たりのアミド化合物の生産量をも低下させるという問題もあった。

- 15      上記のような反応速度の低下や単位菌体量当たりのアミド化合物の生産量低下は、具体的には、回分式反応でアミド化合物を製造する場合には、目標となる蓄積量に達するのに長時間を要し、連続式反応の場合は、設備規模が大きくなるという好ましくない状況を引き起こす。

- 20      従って、本発明の課題は、生体触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法において、ニトリルヒドラターゼ活性が高発現した微生物菌体を包括固定化して用いることにより生じる、反応速度の低下や単位菌体量当たりのアミド化合物の生産量低下等の問題を解決することを目的とする。

- 25      本発明者らは、上記の課題を解決すべく包括固定化触媒よりもより相応しい触媒形態について鋭意検討した結果、ニトリルヒドラターゼ活性を乾

乾燥菌体 1 mg 当たり 10℃で 50 U 以上高発現させた微生物菌体を用い、かつ当該微生物菌体を水性媒体中、懸濁状態でニトリル化合物と接触させると、菌体を包括固定化した場合に比べより高効率にアミド化合物を製造できることを見出し、本発明に至った。

- 5      すなわち、本発明は、微生物触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法において、反応温度 10℃で乾燥菌体 1 mg 当たり 50 U 以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌体を包括固定化しないで水性媒体中でニトリル化合物と接触させることを特徴とする、アミド化合物の製造方法である。

10

#### 発明の開示

以下、本発明を詳細に説明する。

- 本発明で使用する微生物は、反応温度 10℃で乾燥菌体 1 mg 当たり 50 U 以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物であればいずれでも良い。例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、バクテリジウム (*Bacteridium*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属〔特公昭 62-21519 号〕、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属〔特公昭 56-17918 号〕、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属〔特公昭 59-37951 号〕、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属〔特公平 4-4873 号〕、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属〔特公平 4-4873 号、特公平 6-55148 号、特公平 7-40948 号〕、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属〔特開平 6-225780〕、シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属〔特開平 9-275978 号〕に属する微生物が好ましい。さらには、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌がより好ましい。

- 25      また、前記した微生物由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を取得し、そ

のまま又は人為的に改良し、任意の宿主に該遺伝子を導入した形質転換体を使用しても良い。

前記形質転換体としては、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属のニトリルヒドラターゼで形質転換した大腸菌 MT10770 (FERM P-14756) (特開平 8-266277 号)、シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属のニトリルヒドラターゼで形質転換した大腸菌 MT10822 (FERM BP-5785) (特開平 9-275978 号) またはロドコッカス・ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) 種のニトリルヒドラターゼ (特開平 4-211379 号) で形質転換した微生物を例示することができる。

10 本発明でいう酵素活性の単位 U (ユニット) とは、1 分間にニトリル化合物から対応するアミド化合物を 1 マイクロモル生成させることを意味する。ここでいう酵素活性とは、製造に使用するニトリル化合物を用いて測定した酵素活性測定値のことである。

酵素活性の測定方法は、直径 30 mm の試験管に、その酵素の至適 pH (例えば pH 7) に調整した 50 mM のリン酸バッファー 5 mL を入れ、  
15 その中に培養後洗浄した菌体を乾燥重量として 2 mg 懸濁し、10℃ の水槽中で振盪する。約 5 分経過後、予め調整し 10℃ 条件下においていた至適 pH に調整した 1 ~ 5 % のニトリル化合物を含むリン酸バッファーを添加する。任意の反応時間後に生成したアミド化合物の濃度を、ガスクロマト  
20 グラフィーや液体クロマトグラフィー等の分析機器等で測定し、酵素活性を算出する。

反応時間は、反応終了時に、反応速度が低下しない濃度のニトリル化合物が反応液中に残っており、且つ生成するアミド化合物濃度が十分に精度良く測定できる濃度にまで生成している様に設定する。

25 本発明は、酵素活性が乾燥菌体 1 mg 当たり 10℃ で 50 U 以上の微生物

物菌体を用いた場合に効果的であるが、80 U以上、更には100 U以上の微生物菌体を使用した場合には、より効果的である。

本発明でいうニトリル化合物とは、ニトリルヒドラーゼの作用により対応するアミド化合物に変換されるニトリル化合物であり、例えば、アセ  
5 トニトリル、プロピオニトリル、サクシノニトリル、アジポニトリルで例示される脂肪族飽和ニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリルで例示される脂肪族不飽和ニトリル、ベンゾニトリル、フタロジニトリルで例示される芳香族ニトリルおよび3-シアノピリジン、2-シアノピリジンで例示される複素環式ニトリルが挙げられる。ニトリル化合物の化学的  
10 物理的性質、ニトリルヒドラーゼ酵素の基質特異性、産業的工業的観点から、アクリロニトリル、シアノピリジンが本発明の対象として好適である。

本発明でいう包括固定化しない触媒形態とは、微生物の菌体膜が直接反応液に接触するような触媒形態であり、例えば、ポリアクリルアミド、ポ  
15 リビニルアルコール、カラギーナン、寒天、ゼラチン、アルギン酸等の高分子物質で、菌体を包み込む包括固定化方法を行っていない触媒形態を意味する。

即ち、本発明でいう包括固定化しない触媒とは、微生物を培養し、必要に応じて洗浄等を施した微生物菌体そのもの、微生物菌体をグルタルアル  
20 デヒド等の多官能基を有する物質により化学処理した微生物菌体、または微生物菌体をガラスビーズや樹脂、シリカゲル等の表面に化学的に結合させた微生物菌体である。

特にグルタルアルデヒドで化学処理した菌体を触媒として使用することは、触媒の酵素活性安定性向上の点から好ましい。

25 水性媒体中でニトリル化合物と接触させるとは、水又は水にイオン強度、



pH緩衝能若しくはニトリルヒドラーゼ活性安定化剤等を溶解させた水性媒体中で、ニトリル化合物とニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌体を接触させることであり、その方法は回分式でも連続式でも良い。反応基質、反応液、目的化合物等の物性や、生産規模等により反応様式は選  
5 ばれ、反応装置が設計される。

また、反応温度、反応pH等の反応条件はより小規模あるいはより短時間でアミド化合物を製造できるよう最適な条件で制御しつつ実施することが好ましい。

前記方法で蓄積されるアミド化合物の濃度としては、工業的観点から  
10 20%以上が好ましく、より好ましくは、50%以上である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2000-387537 号の明細書に記載された内容を包含する。

#### 15 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。尚、本実施例中でいう%とは、質量%を意味する。

〔実施例1〕 (水性媒体中微生物菌体によるアクリルアミドの製造)

#### 20 (1) 菌の培養

##### ①前培養条件：

(培地組成)

フルクトース 2%、ポリペプトン 5% (日本製薬株式会社)、酵母エキス 0.3% (オリエンタル酵母工業株式会社製)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、  
25  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%、pH 7

## (培養方法)

500 ml 容三角フラスコに培地を100 ml 分注して綿栓をし、  
121℃、20分間オートクレーブで滅菌した。Rhodococcus rhodochrous  
J1 (FERM BP-1478) を接種して30℃で48時間振とう培養した。

## 5 ②本培養条件

## (培地組成)

初期培地： 酵母エキス 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
0.002%、硫安 0.025%、フルクトース 2%、尿素 2%、  
10 エタノール 0.4%、プルロニック L61 0.1% (旭電化工業株式  
会社)、pH 7

後添加培地： フルクトース 20%、エタノール 5%、硫安 6%、  
pH 6.5

## (培養方法)

15 3リッター容ミニジャーファーマンターに初期培地2リッター分注し、  
121℃、20分間オートクレーブで滅菌した。但し、フルクトース、エ  
タノールおよび尿素は、別途、無菌的に濾過して (アドバンテック東洋株  
式会社製0.45ミクロンの濾紙を使用) 培地に加えた。

槽内圧力0.098 MPa、攪拌数600 rpm、通気量1 vvm、pH  
20 7、温度30℃で培養を行い、酵素活性が最も高くなった時点で培養を終  
了した。その後50 mMのリン酸バッファー (pH 7.7) にて洗浄して、  
乾燥菌体重量15%の菌体懸濁液を得た。

## (2) ニトリルヒドラーゼ活性の測定

直径30 mmの試験管に50 mMリン酸バッファー (pH 7.7)  
25 4.98 ml に20  $\mu\text{L}$  の菌体懸濁液を添加混合し、10℃の水槽中にて

5 5 分間振盪させた。これに予め 10℃ にしておいた 5.0% のアクリロニ  
トリルを含む 50 mM リン酸バッファー (pH 7.7) 5 ml を加えて、  
10 分間反応させ、菌体を濾別してから、ガスクロマトグラフィー (GC  
-14B 島津製作所) で生成したアクリルアミドを定量することにより  
5 行った。分析条件はパラボックス PS (ウォーターズ社製カラム充填剤)  
を充填した 1 m ガラスカラムを用い、カラム温度 230℃、検出器は  
250℃ の FID で実施した。その結果、アクリルアミド 1.2% 生成し  
ていた。1 U が、反応温度 10℃、反応時間 1 分間に 1 マイクロモルのアク  
10 リロニトリルからアクリルアミドへ変換させる量と定義した場合、本菌体の  
アクリロニトリルからアクリルアミドへの変換活性は、乾燥菌体 1 mg 当  
たり 10℃ で 56 U であった。

### (3) アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応

1 L のジャケット付きセパラブルフラスコに、50 mM (pH 7.7)  
のトリス (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール)  
15 塩酸バッファーを 664 g 入れ、これに先に得た菌体懸濁液を乾燥菌  
体重量が 90 mg となるように添加した。これを、180 rpm 攪拌下  
18℃ で、アクリロニトリル濃度が常に 2% となるように連続的にアクリ  
ロニトリルを添加した。

その結果、アクリロニトリルの添加開始から 25 時間で生成したアクリ  
20 ルアミド濃度が目的の 45% となった。

### 〔比較例 1〕 (包括固定化微生物菌体によるアクリルアミドの製造)

#### (1) 菌体の包括固定化

実施例 1 で得られた、アクリロニトリルからアクリルアミド変換活性  
56 U の菌体懸濁液を、十分に溶解させた 3% アルギン酸ナトリウム (関  
25 東化学製) 水溶液に等量加え、十分に混和した。この混合液を、内径 2 m

mのシリコンチューブから1 M塩化カルシウム水溶液に滴下し、粒子径約3 mmの固定化菌体粒子を得た。この固定化菌体粒子を、50 mMのトリス塩酸バッファー（pH 7.7に調整）にて洗浄し、固定化菌体を得た。

（2）アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応

5     1 Lのジャケット付きセパラブルフラスコに、50 mM（pH 7.7）のトリス塩酸バッファーを664 g入れ、これに先に得た固定化菌体を乾燥菌体重量90 mgとなる量添加した。これを、180 rpm攪拌下18℃で、アクリロニトリル濃度が常に2%となるように連続的にアクリロニトリルを添加した。

10     その結果、アクリロニトリルの添加開始から50時間経過してもアクリルアミド濃度が目的の45%とならなかった。

〔実施例2〕     （水性媒体中微生物菌体によるアクリルアミドの製造）

（1）菌の培養

特開平2-177883号の実施例に記載された方法を用いて、  
15     *Pseudomonas chlororaphis* B23 (FERM BP-187) 菌を培養した。この菌体のアクリロニトリルからアクリルアミドへの変換活性を実施例1と同様にpH 7.7にて測定したところ乾燥菌体1 mg当たり10℃で90 Uであった。

（2）アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応

内容積が1 Lのジャケット付きセパラブルフラスコに、50 mM（pH  
20     7.7）のリン酸バッファーを850 mL、菌体を乾燥菌体重量として0.4 g添加し、3℃攪拌条件下でアクリロニトリルが常に2%となるように連続的に添加して反応を実施した。

3時間後、アクリルアミド濃度が目的の20%に達していた。

〔比較例2〕     （包括固定化微生物菌体によるアクリルアミドの製造）

25     （1）菌体の包括固定化

アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドおよび2-ジメチルアミノプロピルメタクリルアミドが、それぞれ30, 1, 4%となるようにモノマー混合水溶液を調製した。

続いて、実施例2で得られた、アクリロニトリルからアクリルアミド変換活性90Uの菌体懸濁液、モノマー水溶液、10%のN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン水溶液、10%の過硫酸アンモニウム水溶液を混合比50:20:1:1でラインミキシングし、その流出液を300×300×30mmのパットに次々と受け、そのパット上で重合させた。

製造された菌体固定化ゲルシートをナイフにて0.5mm角程度に細かく裁断しアクリルアミド系ポリマー包括固定化菌体粒子を得た。この固定化菌体粒子を、0.1%のアクリル酸ナトリウム水溶液(水酸化ナトリウムでpH7に調整)にて通液洗浄し、固定化菌体とした。

## (2) アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応

実施例2記載の装置方法にてアクリロニトリルからアクリルアミドへの反応を実施した。

8時間後でも、目的のアクリルアミド濃度20%に達してしなかった。

[比較例3](低ニトリルヒドラターゼ活性微生物菌体によるアクリルアミドの製造)

### (1) 菌の培養と触媒の調製

実施例1と同様に *Rhodococcus rhodochrous* J1 (FERM BP-1478) 菌を培養し、実施例1で示した活性測定法に基づき測定した菌体のアクリロニトリルからアクリルアミドへの変換活性が、乾燥菌体1mg当たり10℃で20Uとなった時点で培養を終了し、その後50mMのリン酸バッファー(pH7.7)にて洗浄して、乾燥菌体重量15%の菌体懸濁液を得た。

(2) アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応

まず、比較例 2 の方法にしたがい、アクリルアミド系ポリマー包括固定化菌体懸濁液を調製した。

次に、微生物として、前述の固定化菌体懸濁液または固定化していない菌体懸濁液を、それぞれ乾燥菌体重量に換算して 225 mg 用いて、アクリロニトリルからアクリルアミドへの反応を行った。その結果、いずれの菌体懸濁液を用いた場合も、約 100 時間経過後に目的のアクリルアミド濃度 45 % に達した。

即ち、20 U の菌体では、固定化菌体および固定化していない菌体間で有意差はなかった。

10

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

15 本発明方法によれば、ニトリルヒドラターゼ活性を高発現した微生物菌体を包括固定化することなく反応に用いるので、包括固定化による反応速度の低下や単位菌体量当たりの生産量低下の問題を生じることなく、ニトリル化合物からアミド化合物を効率よく製造することができる。従って、回分式反応の際には非常に短時間に、連続式反応の際には非常に小規模の  
20 設備で、アミド化合物を製造することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 微生物触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法において、反応温度10℃で乾燥菌体1mg当たり50U以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌体を包括固定化しないで水性媒体中でニトリル化合物と接触させることを特徴とする、アミド化合物の製造方法。
2. 反応温度10℃で乾燥菌体1mg当たり50U以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物が、ノカルディア (*Nocardia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、エアロモナス (*Aeromonas*) 属、シトロバクター (*Citrobacter*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属及びシュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属の群から選択される少なくとも1種である、請求の範囲第1項に記載のアミド化合物の製造方法。
3. 反応温度10℃で乾燥菌体1mg当たり50U以上のニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物が、ノカルディア (*Nocardia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、

- リゾビウム (*Rhizobium*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エンテロバク  
クター (*Enterobacter*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、エアロモナス  
(*Aeromonas*) 属、シトロバクター (*Citrobacter*) 属、アクロモバクター  
(*Achromobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属及びシュ  
5 ードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属の群から選択される少なくとも  
1 種の微生物のニトリルヒドラターゼ遺伝子を発現させた形質転換微  
生物である、請求の範囲第 1 項に記載のアミド化合物の製造方法。
4. ニトリル化合物が、アクリロニトリル又はシアノピリジンである請  
求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれか 1 項に記載のアミド化合物の製造  
10 方法。



**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 (See extra sheet.)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.Cl<sup>7</sup> C12P13/00-13/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 MEDLINE (STN), WPI (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 4001081, A (Agence Nationale de Valorisation de la Recherche), 04 January, 1977 (04.01.77), & JP 51-086186 A	1-4
X	US, 4248968, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 03 February, 1981 (03.02.81), & JP 54-129190 A & JP 54-143592 A & JP 54-143593 A	1-4
X	EP, 93782, A1 (Hideaki YAMADA), 16 November, 1983 (16.11.83), & JP 58-086093 A & WO 83/01784 A1 & US 4637982 A	1-4
X	EP, 188316, A2 (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 23 July, 1986 (23.07.86), & JP 61-162193 A & US 5179014 A	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 13 March, 2002 (13.03.02)

 Date of mailing of the international search report  
 02 April, 2002 (02.04.02)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 307926, A2 (Hideaki YAMADA), 22 March, 1989 (22.03.89), & JP 2-000470 A & US 5334519 A	1-4
X	EP, 204555, A2 (Asahi Kasei Kogyo K.K.), 10 December, 1986 (10.12.86), & JP 62-091189 A & US 5200331 A	1-4
X	JP, 6-225780, A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 16 August, 1994 (16.08.94), (Family: none)	1-4
X	JP, 8-266277, A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 15 October, 1996 (15.10.96), (Family: none)	1-4
X	EP, 790310, A2 (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 20 August, 1997 (20.08.97), & JP 9-275978, A & US 5807730 A & US 5910432 A	1-4
X	EP, 445646, A2 (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 11 September, 1991 (11.09.91), & JP 4-211379 A & US 5731176 A & US 5753472 A	1-4
X	US, 5318908, A (Nitto Kagaku Kogyo K.K.), 07 June, 1994 (07.06.94), & JP 2-177883 A	1-4

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12P13/02// (C12P13/02, C12R1:01) (C12P13/02, C12R1:025)  
(C12P13/02, C12R1:07) (C12P13/02, C12R1:15)  
(C12P13/02, C12R1:18) (C12P13/02, C12R1:22) (C12P13/02, C12R1:265)  
(C12P13/02, C12R1:365) (C12P13/02, C12R1:38)  
(C12P13/02, C12R1:465)  
(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 13/02// (C12P 13/02, C12R 1:01) (C12P 13/02, C12R 1:025) (C12P 13/02, C12R 1:07)  
 (C12P 13/02, C12R 1:15) (C12P 13/02, C12R 1:18) (C12P 13/02, C12R 1:22) (C12P 13/02, C12R 1:265)  
 (C12P 13/02, C12R 1:365) (C12P 13/02, C12R 1:38) (C12P 13/02, C12R 1:465)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 13/00-13/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 4001081 A (Agence Nationale de Valorisation de la Recherche) 1977.01.04 & JP 51-086186 A	1-4
X	US 4248968 A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.) 1981.02.03 & JP 54-129190 A & JP 54-143592 A & JP 54-143593 A	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.03.02

国際調査報告の発送日

02.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 93782 A1 (YAMADA, Hideaki) 1983. 11. 16 & JP 58-086093 A & WO 83/01784 A1 & US 4637982 A	1-4
X	EP 188316 A2 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 1986. 07. 23 & JP 61-162193 A & US 5179014 A	1-4
X	EP 307926 A2 (YAMADA, Hideaki) 1989. 03. 22 & JP 2-000470 A & US 5334519 A	1-4
X	EP 204555 A2 (Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha) 1986. 12. 10 & JP 62-091189 A & US 5200331 A	1-4
X	JP 6-225780 A (三井東圧化学株式会社) 1994. 08. 16 (ファミリーなし)	1-4
X	JP 8-266277 A (三井東圧化学株式会社) 1996. 10. 15 (ファミリーなし)	1-4
X	EP 790310 A2 (MITSUI TOATSU CHEMICALS, INCORPORATED) 1997. 08. 20 & JP 9-275978 A & US 5807730 A & US 5910432 A	1-4
X	EP 445646 A2 (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 1991. 09. 11 & JP 4-211379 A & US 5731176 A & US 5753472 A	1-4
X	US 5318908 A (Nitto Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha) 1994. 06. 07 & JP 2-177883 A	1-4